

冠心病患者巨噬细胞肝 X 受体对其目的基因的表达及胆固醇外流的影响

钱宗杰¹, 曾秋棠¹, 吴旭斌²

(1. 华中科技大学同济医学院协和医院心内科, 湖北省武汉市 430022;

2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 420011)

[关键词] 内科学; 冠心病的发病机制; 逆转录聚合酶链反应; 冠状动脉粥样硬化性心脏病; 巨噬细胞; 肝 X 受体; 胆固醇外流

[摘要] 目的 研究冠心病患者巨噬细胞肝 X 受体及其下游的一些目的基因的表达和胆固醇外流的特点。方法 分离冠心病患者和对照者外周血单核细胞, 并用佛波酯转化为巨噬细胞。各组巨噬细胞用或不用 TO-901317 刺激, 观察载脂蛋白 A iv 介导的胆固醇外流的变化和肝 X 受体及其下游一些目的基因的 mRNA 表达。结果 冠心病患者巨噬细胞影响胆固醇代谢的肝 X 受体 α 基因、ATP 结合盒转运体 A1 基因、固醇调节元件结合蛋白 2 基因、胆固醇酯转运蛋白基因和磷脂转运蛋白 1 基因表达下调, 涉及炎症反应的基质金属蛋白 9 基因和巨噬细胞炎症蛋白 1 α 基因表达上调, 同时载脂蛋白 A iv 介导的胆固醇外流能力下调; 其对刺激肝 X 受体后的反应性也是降低的。结论 冠心病患者巨噬细胞的胆固醇外流功能下降, 一些影响胆固醇代谢及炎症反应的基因的表达发生了改变, 对刺激肝 X 受体信号, 其反应性下降。提示巨噬细胞肝 X 受体信号途径可能是冠心病发病机制中的重要环节, 也是冠心病治疗的潜在靶点。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Live X Receptor Activation and Cholesterol Efflux in Coronary Atherosclerotic Disease Patients

QIAN Zong-Jie, ZENG Qiu-Tang, and WU Xu-Bin

(Institute of Cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[KEY WORDS] Coronary Atherosclerotic Disease; Macrophages; Liver X Receptor; Cholesterol Efflux; Gene Expression; Apolipoprotein A iv

[ABSTRACT] **Aim** To study the characteristic of liver X receptor (LXR) α and its target gene expression and cholesterol efflux from human macrophages of coronary atherosclerotic disease. **Methods** Human monocyte derived macrophages from coronary atherosclerotic disease (CAD) patients and controls was collected. Before being detected apolipoprotein A iv-mediated human monocyte derived macrophage cholesterol efflux and LXR α and mRNA expression of its target gene, the macrophages was induced with or without TO-901317. **Results** Compared with control normal macrophage, the mRNA levels of LXR α and its target gene expression was changed, and the macrophage cholesterol efflux was decreased. After LXR activated, the reactive capacity was also decreased from human monocyte derived macrophage of CAD patients. **Conclusions** The changed function of cholesterol efflux and some gene expression may be the pathogenetic cause, and macrophage LXR activity may offer potential therapeutic benefit in the treatment of CAD.

动脉粥样硬化是一种脂代谢紊乱及慢性炎症疾病, 尽管其发病机制复杂, 但巨噬细胞的致病作用是其中的一种关键因素。巨噬细胞在动脉壁转变为泡沫细胞是动脉粥样硬化病变的启动机制, 巨噬细胞的致动脉粥样硬化作用, 是通过积聚氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 和产

生炎症介质、细胞因子以及细胞外基质降解酶来实现^[1]。在动物模型上, 通过突变基因来改变单核/巨噬细胞的脂代谢或免疫功能, 可影响动脉粥样硬化病变的进展, 基因敲除介导巨噬细胞脂质积聚的清道夫受体或 CD36 以抑制巨噬细胞脂质积聚可减轻动脉粥样硬化病变^[2,3]。巨噬细胞内部, 肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 及其诱导的信号是介导其脂代谢的重要分子基础, 也是巨噬细胞的致动脉粥样硬化的重要环节。本研究试图通过观察冠心病患者巨噬细胞的 LXR 信号途径的一些分子的表达, 来探讨 LXR 在冠心病发病中的作用。

[收稿日期] 2005-04-26

[修回日期] 2005-11-28

[作者简介] 钱宗杰, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向为冠心病, E-mail 为 q8375zj@yahoo.com.cn。通讯作者曾秋棠, 医学博士, 教授, 主要研究方向为介入心脏病学。吴旭斌, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向为冠心病。

1 对象与方法

1.1 对象

选择性冠状动脉造影患者 61 例, 其中男 39 例, 女 22 例, 年龄 35~82 岁, 平均 52.14 ± 5.29 岁, 不包括伴有糖尿病和高血压的患者。按文献[4]所定义的标准, 冠状动脉造影阳性患者 42 例, 另外选择 19 例心脏外科手术者作为对照, 冠状动脉造影未见冠状动脉的影像学改变。

1.2 仪器与试剂

[^3H]胆固醇、载脂蛋白 A iv、TO-901317 均购自 Sigma 公司, 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 购自 Alexis Biochemicals 公司, Trizol 试剂购自 Promega 公司, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂和 DNA 标记 DL-2000 购自 TaKaRa Biotrchnology 公司, XH-6925 液体闪烁计数器为国营二六二厂产品, Tgradient PCR 仪系 Biometra 产品。

1.3 外周血单核细胞的分离

抽取动脉血 10 mL, 采用 Percoll (密度 1.077) 密度梯度离心法分离收集外周血单个核细胞。以 $1 \times 10^{10}/\text{L}$ 细胞浓度加入 6 孔细胞培养板, 每孔 2 mL, 置 37°C 、5% CO_2 贴壁培养 2 h, 收集贴壁的细胞, Giemsa 染色纯度 90% 以上, 2% 台盼蓝染色显示细胞活力 95% 以上。

1.4 巨噬细胞的转化

按文献[5]的方法, 将收集的单核细胞调整为 $3.0 \times 10^9/\text{L}$, 转入 6 孔培养板, 在含有 10% 小牛血清、100 ku/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基中加 $3.2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 PMA, 5% CO_2 、 37°C 的培养箱中孵育 24 h。

1.5 巨噬细胞的处理及胆固醇外流的测定

参照文献[6]描述的方法, 将巨噬细胞调整为 $3.0 \times 10^9/\text{L}$ 的浓度, 转入 6 孔细胞培养板, 在含有 10% 小牛血清、100 ku/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基中加 $0.2 \mu\text{Ci/L}$ [^3H]胆固醇共培养 48 h, 用 PBS 液洗涤细胞。获得的巨噬细胞调整为 $3.0 \times 10^9/\text{L}$ 的浓度, 转入 6 孔细胞培养板, 在上述培养基中, 在实验组加终浓度 $2 \mu\text{mol/L}$ 的 TO-901317, 培养 24 h。再用 PBS 液洗涤细胞, 在无血清含 $10 \mu\text{g/L}$ 载脂蛋白 A iv 新培养液中培育细胞 12 h, 用闪烁计数法检测培养基和细胞的 [^3H]胆固醇。胆固醇流出用培养基中每分钟记数 (counts per minute, CPM) 除以总 CPM, 再乘以 100% 来表示。

1.6 逆转录聚合酶链反应

收集上述各组细胞。按 Trizol 试剂盒说明书提

取总 RNA。取各组细胞总 RNA $2 \mu\text{g}$ 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 10 μL 进行 PCR 循环。 94°C 预变性 5 min, PCR 扩增 34 个循环 (94°C 变性 1 min, 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min) 后, 72°C 再延伸 10 min, 然后 4°C 5 min。PCR 引物由武汉伯杰生物公司合成, LXR α 上游 5'-CTT CTG GAG ACA TCT CGG AGG T-3', 下游 5'-CTG ATA GCA ATG AGC AAG GCA A-3'; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter 1, ABCA1) 上游 5'-ATA AGC CCT CTA TAC ATA AAT GCC-3', 下游 5'-ACA GCG TAA AGT GCT TGG AAT G-3'; 固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol regulatory element binding protein, SREBP2) 上游 5'-ATAG-GTGGCAGGG CAGAAAC-3', 下游 5'-AATCAA-GACGCTACAGCAACT CA-3'; 胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 上游 5'-AAG ATG CCC AAG ATC TCC TG-3', 下游 5'-AAG CTC TGG AGG AAA TCC AC-3'; 磷脂转运蛋白 (phospholipid transfer protein, PLTP) 上游 5'-CTG CGA GAG GTG ATT GAG AAG A-3', 下游 5'-CAG GCT ATG AAT GTG GGA AAA G-3'; 载脂蛋白 E 上游 5'-GCG GAT GGA GGA GAT GGG-3', 下游 5'-AGG CAG GAG GCA CGG GGT-3'; 基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 上游 5'-CTT CCA GTA CCG AGA GAA AGC C-3', 下游 5'-CAA AGG TGA GAA GAG AGG GCC-3'; 巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α) 上游 5'-CGC CTG CTG CTT CAG CTA CAG-3', 下游 5'-TGT GGA GGT CAC ACG CAT GTT-3'; GAPDH 上游 5'-CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT-3', 下游 5'-TGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TA-3'。反应结束后, 取反应产物 10 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以二者的比值代表各基因的表达量。

1.7 统计学处理

在 SAS 统计分析软件上分析各组数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据数据特征作方差分析和 χ^2 检验及 t 检验。

2 结果

2.1 冠心病患者巨噬细胞胆固醇外流及 TO-901317 对其的影响

冠心病患者由载脂蛋白 A iv 介导的巨噬细胞胆固醇外流明显低于对照组; 在加 TO-901317 的情况

下,无论是冠心病组还是对照组,均可增加胆固醇外流,但冠心病组巨噬细胞的胆固醇外流要低于对照组(表 1)。

表 1. TO-901317 对载脂蛋白 A_{iv}介导的巨噬细胞胆固醇外流的影响

处理方式	对照组 (n= 19)	冠心病组 (n= 42)
未加 TO-901317	9.21 ± 0.34	4.43 ± 0.78 ^a
加 TO-901317	17.73 ± 1.32 ^b	11.33 ± 1.41 ^{cd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与未加 TO-901317 的对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与未加 TO-901317 的冠心病组比较; d 为 $P < 0.05$, 与加 TO-901317 的对照组比较。

2.2 冠心病患者巨噬细胞肝 X 受体 α 及下游基因 mRNA 表达和 TO-901317 对其的影响

冠心病患者巨噬细胞涉及胆固醇外流的基因 LXR α 、ABCA1、SREBP2、PLTP、CETP 的 mRNA 表达水平低于对照组,而涉及炎症反应的基因 MMP-9、MIP-1 α 的 mRNA 表达水平则高于对照组。在加 TO-901317 的作用下,与对照组一样,冠心病患者巨噬细胞涉及胆固醇外流基因的 mRNA 都是增加的,涉及炎症反应基因的 mRNA 的表达水平降低(表 2)。另外,在加 TO-901317 的作用下,冠心病患者巨噬细胞各基因(除载脂蛋白 E 外)的 mRNA 表达水平的改变都小于对照组(表 3)。冠心病患者巨噬细胞各基因的表达情况见图 1 所示。

表 2. 冠心病患者巨噬细胞肝 X 受体 α 及其目的基因的表达 ($\bar{x} \pm s$)

目的基因	对照组 (n= 19)		冠心病组 (n= 42)	
	未加 TO-901317	加 TO-901317	未加 TO-901317	加 TO-901317
LXR α	48.23 ± 4.15	64.36 ± 7.34 ^b	42.73 ± 5.18 ^a	50.46 ± 3.87 ^{ce}
ABCA1	40.83 ± 3.49	58.73 ± 3.47 ^b	29.35 ± 3.14 ^a	41.27 ± 9.21 ^{ce}
SREBP2	37.43 ± 6.72	45.63 ± 5.81 ^a	25.37 ± 2.83 ^b	31.29 ± 2.32 ^{ce}
CETP	45.27 ± 3.32	59.16 ± 6.18 ^a	37.33 ± 7.57 ^a	50.22 ± 4.34 ^{de}
PLTP	47.34 ± 5.17	58.73 ± 2.33 ^a	33.53 ± 8.72 ^a	40.43 ± 7.03 ^{df}
载脂蛋白 E	34.71 ± 4.46	42.71 ± 6.42 ^a	29.46 ± 7.12	35.27 ± 6.28 ^{ce}
MMP-9	35.58 ± 6.02	30.35 ± 4.18 ^a	42.19 ± 5.07 ^a	34.05 ± 2.11 ^{ce}
MIP-1 α	29.93 ± 3.71	21.14 ± 4.81 ^a	37.44 ± 3.23 ^b	30.13 ± 4.09 ^{ce}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与未加 TO-901317 的对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与未加 TO-901317 的冠心病组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与加 TO-901317 的对照组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化形成的启动因素是循环中的单核细胞进入血管内皮下间隙并分化为巨噬细胞,当氧化型或经修饰的 LDL 存在时,这些巨噬细胞就积聚

胆固醇酯而转化为泡沫细胞。刺激动脉壁中巨噬细胞胆固醇外流而转化成高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL), 抑制泡沫细胞的形成,从而阻止动脉粥样硬化的发生。

表 3. TO-901317 对冠心病患者巨噬细胞肝 X 受体 α 及其目的基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

目的基因	对照组 (n= 19)	冠心病组 (n= 42)
LXR α	19.32 ± 3.43	9.43 ± 8.72 ^b
ABCA1	17.47 ± 1.33	11.26 ± 1.78 ^b
SREBP2	7.58 ± 3.21	6.47 ± 2.71
CETP	15.74 ± 7.74	13.73 ± 1.71
PLTP	12.19 ± 2.48	6.38 ± 1.27 ^a
载脂蛋白 E	7.33 ± 1.13	6.23 ± 2.67
MMP-9	6.27 ± 2.14	7.49 ± 1.71
MIP-1 α	9.43 ± 3.13	6.21 ± 3.34 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

肝 X 受体 (LXR) 属核受体超家族的配体激活的转录因子,其成员有 LXR α (NR1H3) 和 LXR β (NR1H2)。LXR α 主要在肝、肾脏、脾、肠等组织以及巨噬细胞上表达,而 LXR β 在几乎所有组织细胞上表达。LXR 与视黄醛核受体 (retinoic acid receptor, RXR) 以杂聚二集体形式存在,胆固醇的一些代谢产物是其内源的激活配体,如羟基固醇 24(S), 25-环氧胆固醇、24(S)-羟基胆固醇和 22(R)-羟基胆固醇,人工合成的 GW3965、TO901317 是其特异的激活剂。另一方面,多不饱和酸、亚油酸和纤维酯类是 LXR 的拮抗剂。LXR 通过直接结合在靶基因的 DR4 (direct repeat four) 序列位点,即 LXR 反应元件 (LXR response element, LXRE), 调节靶基因的表达,同其他的核受体超家族的成员一样,是一种转录因子,通过与共刺激因子或抑制因子的相互作用来发挥刺激或抑制目的基因的表达。近年来的研究表明,许多涉及脂代谢平衡、炎症及免疫反应的基因均接受 LXR 的调节^[7-9]。巨噬细胞中, LXR 在内源性配体激活后, LXR 作用于靶基因 DR4 序列,如 ATP 结合盒转运子、SREBP, 脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL)、PLTP、载脂蛋白 E 及载脂蛋白 C_{iv}、载脂蛋白 C_③、载脂蛋白 C_④、CETP 等,以及这些靶基因对其下游的基因的作用,调节巨噬细胞的脂代谢平衡^[9-11]。同时激活的 LXR 抑制一些致炎基因的表达,如诱导型一氧化氮合酶、环氧合酶 2、白细胞介素 1 和 6、MMP-9 及细胞因子单核细胞趋化蛋白 1 和 3、MIP-1 和 IP-10 等^[9]。

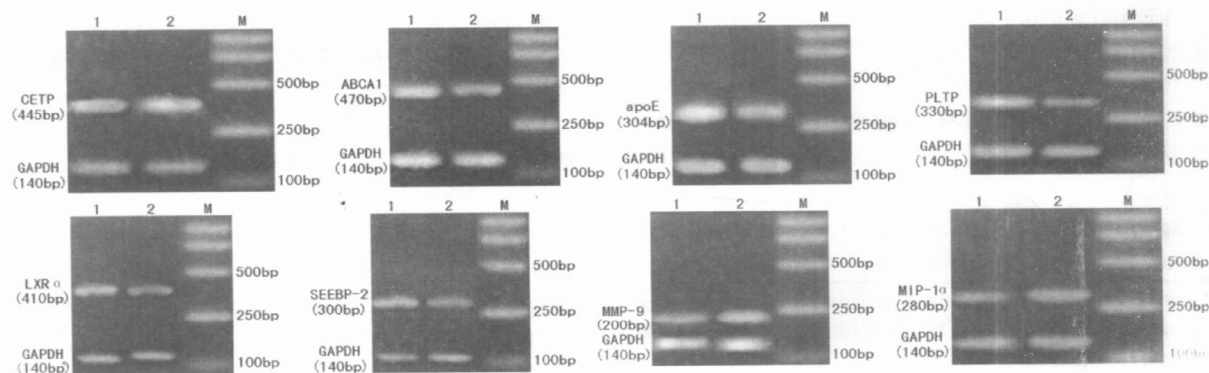


图 1. 冠心病患者肝 X 受体 α 及其目的基因的逆转录聚合酶链反应产物电泳图 1 为加 TO-901317, 2 为未加 TO-901317, M 为 DNA 分子量标准。

许多实验研究显示 LXR 及其下游基因在动脉粥样硬化中的作用, 例如 Tangirala 等^[12] 的研究发现, 在载脂蛋白 E 或 LDL 受体缺陷的小鼠, 接受 LXR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$ 小鼠的骨髓移植, 其动脉粥样硬化病变明显重于接受野生型骨髓移植的小鼠。此外, 不管是否接受的是 LXR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$ 还是 LXR $\alpha^{+/+}\beta^{+/+}$ 小鼠的骨髓, 在 LDL 受体基因缺陷的小鼠, 总的血浆胆固醇水平是一样的, 但是接受 LXR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$ 小鼠骨髓的小鼠, 其动脉粥样硬化程度明显要重。这都说明了 LXR 的动脉粥样硬化的保护作用。本研究通过对冠心病患者巨噬细胞胆固醇外流和 LXR α 及其下游的一些目的基因表达水平的研究, 发现冠心病患者巨噬细胞一些影响胆固醇代谢及炎症反应的基因的表达发生改变, 胆固醇的外流能力下调, 并且对刺激 LXR 后的反应性也是降低的, 这可能是冠心病的结局, 巨噬细胞的这种功能障碍也可能是冠心病发病的原因。

[参考文献]

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. *Nature*, 2000, **407**: 233-241
- [2] Febbraio M. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice[J]. *J Clin Invest*, 2000,

105: 1 049-056

- [3] Suzuki H. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection[J]. *Nature*, 1997, **386**: 292-295
- [4] Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, Califf RM, Hillis LD, Hiratzka LF, et al. ACC/AHA guidelines for coronary angiography: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on coronary angiography)[J]. *JACC*, 1999, **33**: 1 756-824
- [5] Suzuki S, Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Inoue K, Arakawa R, Abe-Dohmae S, et al. Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via liver X receptor-independent mechanism[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2004, **24**: 519-525
- [6] Lin GR, Bornfeldt KE. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **290**: 663-669
- [7] Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM, Wilson JG, et al. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXR α gene in human macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 43 509-515
- [8] Joseph SB, Castrillo A, Laffite BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors[J]. *Nature Medicine*, 2003, **9**: 213-219
- [9] Ricote M, Valledor AF, Glass CK. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 230-239
- [10] Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element[J]. *J Clin Invest*, 2000, **105**: 513-520
- [11] 唐朝克, 易光辉, 唐国华, 王佐, 王燕, 刘录山, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 32-36
- [12] Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffite BA, et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 11 896-901

(此文编辑 文玉珊)